基础研究

miR-20b 抑制哮喘小鼠的气道炎症

马 华[1],罗玉岚[1],郭术俊[1],申 林[2],宋传旺[1]
[1]蚌埠医学院免疫学教研室//安徽省感染与免疫重点实验室,[2]蚌埠医学院科研中心,安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探讨miR-20b对哮喘小鼠气道炎症的影响。**方法** BALB/c小鼠随机分为正常对照组、哮喘组、哮喘+miR-20b模拟物处理组、哮喘+miR-20b模拟物对照处理组。卵清白蛋白(OVA)致敏和激发构建哮喘模型小鼠,miR-20b模拟物及其对照采用鼻滴的方式给药干预。实验流程的第49天检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中的细胞总数和分类计数,肺组织进行HE染色观察病理学变化,ELISA检测BALF中血管内皮生长因子(VEGF)的浓度。**结果** 哮喘小鼠经miR-20b模拟物处理后,BALF中细胞总数及中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的分类计数明显降低(P<0.01),并且气道黏膜增厚减轻,气道腔内粘液分泌及支气管周围炎性细胞的浸润减少。与哮喘组BALF中VEGF的含量28.55±3.42 pg/mL相比,哮喘+miR-20b模拟物处理组的含量18.19±3.67 pg/mL明显降低(P<0.01)。**结论** miR-20b对哮喘小鼠气道炎症产生抑制作用,这一效应可能是通过降低VEGF的表达来介导。

关键词:miR-20b;哮喘;气道炎症;血管内皮生长因子

Inhibitory effect of miR-20b on airway inflammation in asthmatic mice

MA Hua[1], LUO Yulan[1], GUO Shujun[1], SHEN Lin[2], SONG Chuanwang[1]
Department of Immunology, Anhui Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity[1], Scientific Research Center[2], Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To explore the effect of miR-20b in inhibiting airway inflammation in a mouse model of asthma. **Methods** Female BALB/c mouse models of asthma, established by sensitizing and challenging the mice with a mixture of ovalbumin and aluminum hydroxide, were subjected to intranasal instillation of 20 μg miR-20b mimics or a miR-20b scramble every 3 days. On day 49, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected from the mice to examine the counts of total cells and different cell populations; HE staining was used to observe the pathological changes of the lung tissue, and the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in BALF was detected by ELISA. **Results** Treatment of the asthmatic mice with miR-20b mimics decreased not only the counts of the total leukocytes, neutrophils and eosinophils in the BALF but also mucus secretion in the airway and inflammatory cell infiltration around the bronchus, and lessened thickening of the airway mucosa. Instillation with miR-20b mimics significantly reduced the concentration of VEGF in BALF from 28.55±3.42 pg/mL in the asthma model group to 18.19±3.67 pg/mL (P<0.01). **Conclusion** MiR-20b can inhibit airway inflammation in asthmatic mice possibly by reducing the expression of VEGF.

Key words: miR-20b; asthma; airway inflammation; vascular endothelial growth factor

支气管哮喘(简称哮喘)是一种由多种细胞和炎性因子引起的慢性气道炎症。气道的高反应性、慢性炎症和气道重塑是哮喘的基本特征[1-2]。流行病学研究发现:近年哮喘的发病率和死亡率有逐年增高的趋势,但目前其发病机制仍然不清[3]。miRNAs是一组长度约为22个核苷酸的非编码RNA,其可通过抑制靶基因的翻译或引起靶基因mRNA降解来调控靶基因的表达[4]。最新的研究发现miRNAs在哮喘的发病中起到重要作用[5-6]。本课题组前期的研究发现哮喘小鼠肺组织中miR-20b的表达明显低于正常小鼠,但miR-20b对哮喘发病的进程有何影响还不清楚[7]。本研究拟构建哮喘模型小鼠,观察鼻滴miR-20b模拟物后小鼠肺部病理变化的特点,以探讨miR-20b在哮喘发病中的可能作用。

收稿日期:2015-07-10
基金项目:国家自然科学基金(81273273);安徽省自然科学基金(1308085MH114)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81273273).
作者简介:马 华,实验师,E-mail: bbmcmahua@163.com
通信作者:宋传旺,博士,教授,硕士生导师,E-mail: chuanwangsong@163.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

鸡卵清白蛋白(OVA)、氢氧化铝(Inject Alum)分别是Sigma公司和PIERCE公司产品,VEGF ELISA试剂盒购于武汉华美公司,miR-20b mimics 和其对照是由

上海吉玛公司设计合成，序列如下：miR-20b mimicssense：CAA AGU GCU CAU AGU GCA GGU AG，antisense：ACC UGC ACU AUG AGC ACU UUG UU，miR-20b mimics controlsense：UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT，antisense：ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT。YLS-8A多功能诱咳引喘仪是济南益延科技发展有限公司出品，ELISA酶标仪购于BioTek公司。

1.2 实验动物及哮喘模型的建立

雌性BALB/c小鼠(2~3周龄)购于蚌埠医学院实验动物中心，随机分为4组：正常对照组(Control)、哮喘组(Asthma)、哮喘+miR-20b模拟物处理组(MiR-20b mimics)、哮喘+miR-20b模拟物对照处理组(MiR-20b scramble)，每组7只小鼠。除正常对照组外，其余3组于实验第0天、7天和14天小鼠腹腔内注射200 μL致敏液(含OVA 50 μg，氢氧化铝2 mg)，从实验第21天起，将小鼠置于雾化吸入箱中，每天用5% OVA溶液雾化吸入激发(图1)，每次雾化30 min，连续雾化4周。MiR-20b mimics组小鼠于实验第20天起，经鼻滴20 μg miR-20b mimics 40 μL/次，1次/3 d，共进行10次。MiR-20b scramble组则以MiR-20b scramble代替miR-20b mimics进行(图2)。



图1 本研究采用的雾化装置

Fig.1 Atomization device used in this experiment.

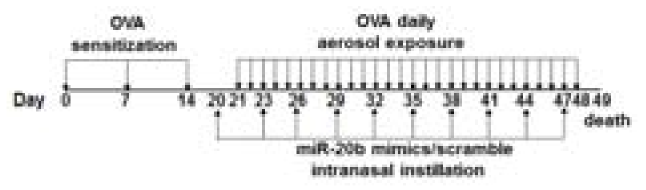


图2 本研究采用的流程图

Fig.2 Experimental model procedure in this study.

1.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数

实验第49天，各组小鼠被拉颈处死，进行气管插管，留置12号针头并固定，用PBS进行支气管肺泡灌洗，0.8 mL/次，连续6次。收集BALF离心，上清低温保存待用，沉淀红细胞裂解后进行细胞计数及涂片、瑞氏染色分类计数。

1.4 BALF中VEGF的检测

收集各组小鼠BALF中上清，采用ELISA方法检测VEGF的含量，详细的方法见试剂盒说明书。

1.5 肺组织HE染色

收集各组小鼠左肺组织，4%多聚甲醛液中固定1周，常规酒精脱水，然后二甲苯透明及石蜡包埋，制备5 μm厚的石蜡切片，经脱蜡、浸泡等常规处理后苏木精-伊红染色，然后二甲苯透明、中性树脂封片，光镜下观察拍照。

1.6 统计学分析

数据采用均数±标准差表示，统计软件是SPSS 16.0，组间比较使用方差分析，P<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-20b对BALF中细胞总数和细胞分类计数的影响

哮喘组小鼠BALF中细胞总数及淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的分类计数均较正常对照组明显升高(P<0.01)，哮喘小鼠经miR-20b mimics处理后，细胞总数及中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的分类计数均明显降低(P<0.01)，但淋巴细胞的计数不受影响。哮喘+miR-20b scramble处理组与哮喘组相比，上述细胞数无明显变化(图3,4)。

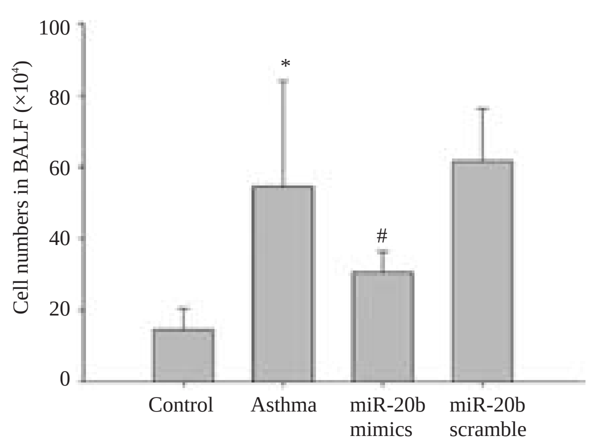


图3 miR-20b对BALF中细胞总数的影响

Fig.3 Effect of miR-20b on the total numbers of cells in BALF. Control: normal control group; Asthma: asthma group; MiR-20b mimics: asthma + miR-20b analogues treatment group; MiR-20b scramble: asthma + miR-20b scramble treatment group. *P<0.01 *vs* control group; #P<0.01 *vs* asthma group.

2.2 miR-20b对肺组织病理学变化的影响

肉眼观察：正常小鼠肺组织均匀红润，而哮喘小鼠肺体积明显增大，肺表面多个区域肿胀泛白，呈地图状。哮喘+miR-20b mimics处理组小鼠肺体积较哮喘组有所减少，部分泛白区域趋于红润。哮喘+miR-20b scramble组小鼠肺大体与哮喘组类似(图5)。

肺组织HE染色后镜下观察：正常对照组小鼠支气管及肺泡壁结构完整、规则，无明显增生、增厚，支气管

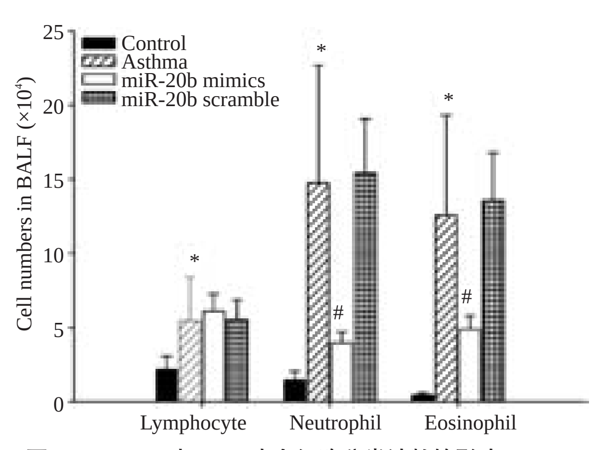


图4 miR-20b对BALF中白细胞分类计数的影响

Fig.4 Effect of miR-20b on the leukocyte classification counts in BALF. Control: normal control group; Asthma: asthma group; MiR-20b mimics: asthma + miR-20b analogues treatment group; MiR-20b scramble: asthma + miR-20b scramble treatment group. *P<0.01 *vs* control group; #P<0.01 *vs* asthma group.

管腔光滑，官腔中未见明显渗出物。哮喘组小鼠气道粘膜水肿增厚，褶皱增加，平滑肌增生，管腔狭窄，管腔中有大量粘液分泌，支气管周围有明显的炎性细胞浸润。哮喘小鼠经miR-20b mimics处理后，黏膜增厚减轻，管腔规则，无明显平滑肌增生，仅有少量的粘液分泌，支气管周围炎性细胞的浸润也有所减轻。但哮喘小鼠经miR-20b scramble处理后肺组织形态改变不明显(图6)。

2.3 miR-20b对BALF中VEGF水平的影响

VEGF在慢性哮喘的发病中起到重要作用，因此我们对miR-20b是否影响BALF中VEGF的表达进行了观察。结果如图7：哮喘组小鼠BALF中VEGF浓度28.55±3.42 pg/mL较正常组16.13±2.61 pg/mL明显升高（P<0.01）；哮喘小鼠经miR-20b mimics处理后，BALF中VEGF含量降为18.19 ± 3.67 pg/mL，但MiR-20b scramble的处理对其无明显影响(图7)。

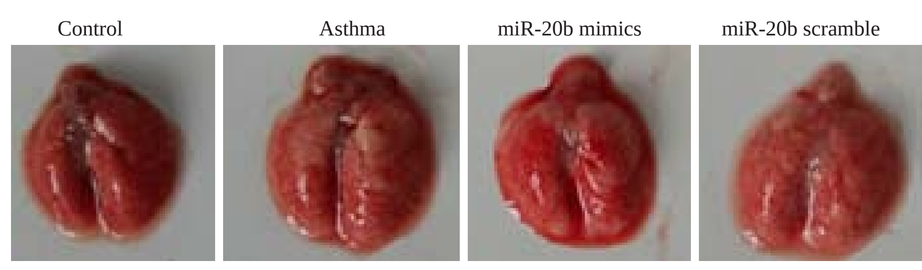


图5 miR-20b对肺大体形态的影响

Fig.5 Effect of miR-20b on the morphology of the lung. Control: normal control group; Asthma: asthma group; MiR-20b mimics: asthma + miR-20b analogues treatment group; MiR-20b scramble: asthma+miR-20b scramble treatment group.

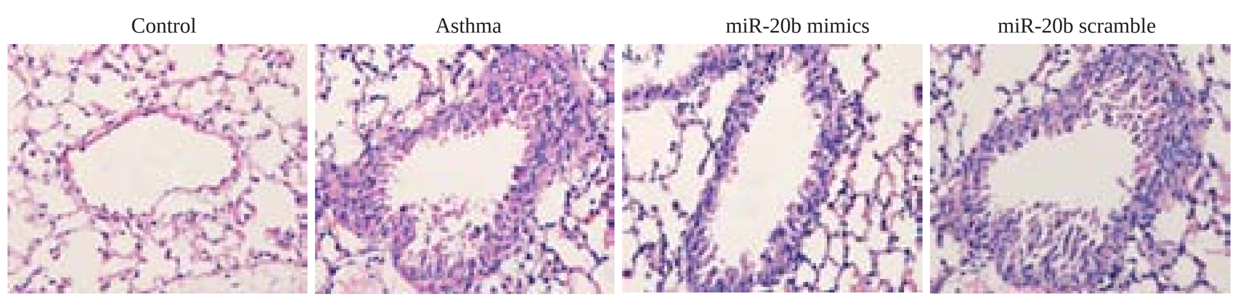


图6 miR-20b对肺组织病理学变化的影响

Fig.6 Effectof miR-20b on pathological changes of lung tissue. Control: normal control group; Asthma: asthma group; MiR-20b mimics: asthma+miR-20b analogues treatment group; MiR-20b scramble: asthma+miR-20b scramble treatment group.

3 讨论

哮喘是呼吸系统最常见的疾病之一，流行病学调查研究表明，目前全球约有3亿哮喘患者，平均每年因哮喘死亡的病例多达250 000人，并且哮喘的发病率、死亡率有逐年增高的趋势，哮喘已成为世界性的社会公共卫生问题[8]。

哮喘的实质是气道的一种慢性炎症，多种因素牵涉其中，目前确切的发病机制仍然不清[9]。miRNAs是一种约22个核苷酸长度的非编码RNA，其主要通过阻止翻译或mRNA的转录从而控制细胞的生长发育、增殖、凋亡等生物学过程[10]。近期有多个课题组报道miRNAs对哮喘的发病产生了重要影响。Simpson等[11]的研究表明：哮喘病人气道浸润T细胞miR-19的表达升高，miR-19促进Th2型细胞因子的产生并增加了气道炎症反应，miR-17~92基因簇缺陷的T细胞，Th2极化反应明显降低，该研究指出哮喘中miR-19的上调可能是气道Th2型细胞因子产生增加的标志和原因。Haj-Salem[12]则证明重度哮喘病人支气管上皮细胞miR-19a的表达上调，miR-19a通过靶向TGF-β受体2而增加支气管上皮细胞的增殖，从而在气道重塑中起到

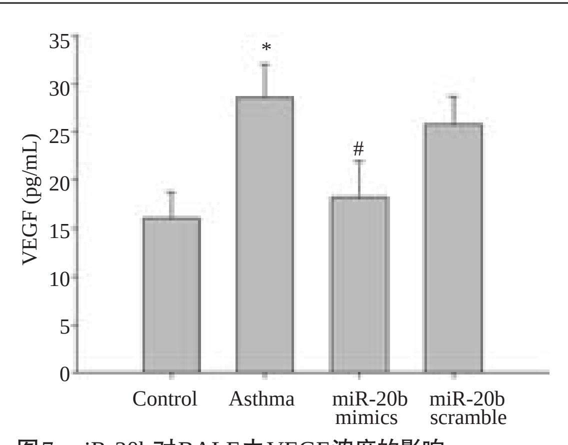


图7 miR-20b对BALF中VEGF浓度的影响

Fig.7 Effectof miR-20b on the concentration of VEGF in BALF. Control: normal control group; Asthma: asthma group; MiR-20b mimics: asthma + miR-20b analogues treatment group; MiR-20b scramble: asthma + miR-20b scramble treatment group. **P*<0.01 *vs* control group; #*P*<0.01 *vs* asthma group.

重要作用。Martinez-Nunez课题组[13]发现,哮喘病人支气管上皮细胞miR-18a、miR-27a、miR-128、miR-155的表达下调,并且有趣的是只有当所有这些成分的功能同时被抑制时,才能控制IL-6、IL-8等炎性因子的表达上调,而单个miRNA的调节并无此效应。我们前期的研究发现:与正常小鼠相比,哮喘小鼠肺泡巨噬细胞miR-20b的表达明显下调[7]。本研究则进一步证明miR-20b可以抑制哮喘小鼠气道的炎症。miR-20b属于miR-106a-363基因簇成员,位于X染色体[14]。目前关于miR-20b的研究相对较少,Lei等[15]人的研究表明,低氧状态下,miR-20b的升高降低了H22肝癌细胞VEGF与HIF-1α蛋白的表达,miR-20b可以负性调节这种细胞VEGF的表达。此后,Cascio等[16]又证明在MCF-7乳腺癌细胞中miR-20b可通过靶向HIF-1α与STAT-3降低VEGF的表达。VEGF是最重要的血管生成诱导因子,涉及多种生理性(胚胎发育、骨骼生长、生殖功能)和病理性(肿瘤、缺血、炎症)的血管发生过程[17-18]。VEGF一方面可引起血管通透性增加,导致炎性细胞和介质渗出到气道血管外间隙内,产生气道炎症;另一方面它能刺激血管内皮细胞增殖,促进气道新生血管生成,在气道重塑中起到重要作用,因此VEGF对于哮喘的发病具有重要的病理生理学意义[19]。我们前期的研究证明哮喘小鼠肺泡巨噬细胞VEGF的表达上调,与miR-20b的表达正好相反,本研究进一步证明miR-20b的作用使BALF中VEGF的含量降低。miRNAs的作用主要是通过其5'端7-8个碱基的"种子区"(seed region)与靶基因3'-UTR互补结合来抑制靶基因的表达。根据miRanda算法(http://www.microrna.org/microrna/),VEGF的3'-UTR区含有miR-20b的作用靶点。因此miR-20b可能是通过直接靶向VEGF而抑制哮喘小鼠气道炎症,当然,要明确此问题,仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015(8): 879783.

[2] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(1): 57-65.

[3] Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment[J]. BMJ. 2014, 349: g5517.

[4] Su Z, Yang Z, Xu Y, et al. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis[J]. Oncotarget. 2015, 6(11): 8474-90.

[5] Perry MM, Adcock IM, Chung KF. Role of microRNAs in allergic asthma: present and future [J]. CurrOpin Allergy ClinImmunol, 2015, 15(2): 156-62.

[6] Kai W, Qian XU, Qun WU. MicroRNAs and Asthma Regulation [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015, 14(2): 120-5.

[7] Song C, Ma H, Yao C, et al. Alveolar macrophage-derived vascular endothelial growth factor contributes to allergic airway inflammation in a mouse asthma model [J]. Scand J Immunol, 2012, 75(6): 599-605.

[8] Wang HY, Wong GW, Chen YZ, et al. Prevalence of asthma among Chinese adolescents living in Canada and in China [J]. CMAJ, 2008, 179(11): 1133-42.

[9] Woo Y, Jeong D, Chung DH, et al. The roles of innate lymphoid cells in the development of asthma[J]. Immune Netw, 2014, 14(4): 171-81.

[10] Takasaki S. Roles of microRNAs in cancers and development [J]. Methods MolBiol, 2015, 1218: 375-413.

[11] Simpson LJ, Patel S, Bhakta NR, et al. A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production [J]. Nat Immunol, 2014, 15(12): 1162-70.

[12] Haj-Salem I, Fakhfakh R, Bérubé JC, et al. MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGFβR2 gene in severe asthma [J]. Allergy, 2015, 70(2): 212-9.

[13] Martinez-Nunez RT, Bondanese VP, Louafi F, et al. A microRNA network dysregulated in asthma controls IL-6 production in bronchial epithelial cells [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111659.

[14] Landais S, Landry S, Legault P, et al. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia [J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5699-707.

[15] Lei Z, Li B, Yang Z, et al. Regulation of HIF-1alpha and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration [J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7629.

[16] Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells [J]. J Cell Physiol, 2010, 224(1): 242-9.

[17] Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(12): 871-82.

[18] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 669-76.

[19] Meyer N, Akdis CA. Vascular endothelial growth factor as a key inducer of angiogenesis in the asthmatic airways [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2013, 13(1): 1-9.

(编辑:经 媛)